

5/19/1

010354638 **Image available**

WPI App No: 1995-255952/149534

Related WPI App No: 1995-01693

XRAM App No: C95-116936

Ribozyme library in optimised expression cassette -**comprises central hammerhead region and variable flanking regions, allows selection of optimum ribozyme for specific applications**

Patent Assignee: MAX PLANCK GES FOERDERUNG WISSENSCHAFTEN (PLAC)

Inventor: LIEBER A; STRAUSS M

Number of Countries: 010 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 4424762	C1	19940704	DE 4424762	A	19940704	199534 B
WO 9601314	A2	19960116	WO 9601314	A	19960116	199601
WO 9601314	A3	19960116	WO 9601314	A	19960116	199601
EP 776363	A1	19970604	EP 776363	A	19970604	199707
			WO 9601314	A	19960116	
EP 776363	B1	19991122	EP 776363	A	19990819	100014
			WO 9601314	A	19960116	
US 6130092	A	20001010	US 6130092	A	19940828	100052
			US 6431458	A	19940828	
			US 6671280	A	19960812	
			US 6788767	A	19970703	

Priority Applications (No Type Date): DE 4424762 A 19940704; DE 4424761 A 19940704

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; FR 2687411

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

DE 4424762 C1 10 C12N-015/63

WO 9601314 A2 G 16 C12N-015/11

Designated States (National): CA JP

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL FT SE

WO 9601314 A3 C12N-015/63

EP 776363 A1 G C12N-015/11 Based on patent WO 9601314

Designated States (Regional): BE CH DK EP GB IT LI NL SE

EP 776363 B1 G C12N-015/11 Based on patent WO 9601314

Designated States (Regional): BE CH DK EP GB IT LI NL SE

US 6130092 A C12N-015/09 Cont of application US 94314587

CIP of application US 94314588

CIP of application US 96712803

CIP of patent US 6695936

Abstract (Basic): DE 4424762 C

Ribozyme library comprises an optimised expression cassette (EC) which contains a ribozyme genes consisting of a central hammerhead sequence, i.e. double stranded DNA of formula 5'-GTGATGAGTGGCTGAGGACGAAAC (HH) plus, on each side, flanking sequences of 6-12 random nucleotides.

The library is used to select optimum ribozymes for partic. applications, partic. switching of genes for therapeutic purposes (e.g. treatment of AIDS), but also in molecular biology and genetic engineering.

Selected ribozymes can be expressed effectively and used in vivo.

Dwg.3/5

1017
↓

5' GTGTACGGCGCCTC TGACAGCAACGTC 3'

3' TGCTGCATNNNNNGCCGCGGA 5' 3' ACTGTCGNNNNNGAGCTT

Nsil XhoI

3' GACGTANNNNNNNNNCA NNNNNNNNNNNCTCGA

Nsil XhoI

G
A C T
A
G
C G T A
A T
G C
G C
A G
G T

5' GTGTACGGCGCCTC TGACAGCAACGTC 3'

E1(13/13) 3' GACGTA CACATGCGCGGA ACTGTCTGTCAG CTC

E1(10/11) 3' GACGTA AGAATGCGCGGA ACTGTCTGTCAG CA CTC

E1(8/7) 3' GACGTA GAATAGCGCGGA ACTGTCTGTCGAATC CTC

Nsil Xh

A C T
⊗
G
C G T A
A T
G C
G C
A G
G T

Title Terms: LIBRARY; OPTIMUM; EXPRESS; CASSETTE; COMPRISE; CENTRAL; REGION
; VARIABLE; FLANK; REGION; ALLOW; SELECT; OPTIMUM; SPECIFIC; APPLY

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09; C12N-015/11; C12N-015/63

International Patent Class (Additional): C12N-009/00; C12N-015/86;

C12P-019/34; C12Q-001/68

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E01; B14-A02B1; D05-H09; D05-H12D4; D05-H19

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M731 M903 Q233 V753

Derwent WPI (Dialog® File 351) (c) 2002 Thomson Derwent. All rights reserved

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



24743

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/11, 15/63, 15/86, 9/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/01314 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Januar 1996 (18.01.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/00662 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Mai 1995 (19.05.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 24 762.1 4. Juli 1994 (04.07.94) DE (71) Anmelder: MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE). (72) Erfinder: LIEBER, Andre; Arkonastrasse 57, D-13189 Berlin (DE). STRAUSS, Michael; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biozet Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: RIBOZYME LIBRARY, ITS PRODUCTION AND USE (54) Bezeichnung: RIBOZYM-BIBLIOTHEK, IHRE HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG (57) Abstract The object of the invention is to allow the production of optimum ribozymes for any desired target sequence. It should be possible to effectively express and use <i>in vivo</i> these ribozymes, preferably to identify and neutralise genes for the treatment of diseases. The invention has applications in molecular biology, genetic engineering and medicine. For that purpose, a ribozyme library is constructed that contains 10 ⁹ -10 ¹¹ ribozyme genes in an optimised expression cartridge. The ribozyme genes consist of a central Hammerhead structure having a defined sequence flanked by sequences with a random series of bases. The sequences located on both sides of the Hammerhead structure preferably contain 6-13 nucleotides. In order to use this ribozyme library, it is incubated with a material containing the desired target sequence, the thus obtained split products are identified and the ribozymes responsible for the splitting are isolated. (57) Zusammenfassung Die Erfindung hat das Ziel, die Bereitstellung optimaler Ribozyme für beliebige Zielsequenzen zu ermöglichen. Diese Ribozyme sollen effektiv exprimierbar und <i>in vivo</i> einsetzbar sein, vorzugsweise für die Identifizierung und zum Abschalten von Genen bei Erkrankungen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekularbiologie, die Gentechnik und die Medizin. Erfindungsgemäß wird eine Ribozym-Bibliothek aufgebaut, die in einer optimierten Expressionskassette 10 ⁹ -10 ¹¹ Ribozym-Gene enthält. Diese Ribozym-Gene bestehen aus einer zentralen Hammerhead-Struktur definierter Sequenz und flankierenden Sequenzen zufälliger Basenfolge. Die flankierenden Sequenzen auf beiden Seiten der Hammerhead-Struktur umfassen bevorzugt 6-13 Nukleotide. Die Verwendung dieser Ribozym-Bibliothek erfolgt durch Inkubation mit dem die gewünschte Zielsequenz enthaltenden Material, Identifizierung der erhaltenen Spaltprodukte und Isolierung der für die Spaltung verantwortlichen Ribozyme.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Ribozym-Bibliothek, ihre Herstellung und ihre Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Ribozym-Bibliothek, ihre Herstellung und Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekularbiologie, die Gentechnik und die Medizin.

Die Inaktivierung von Genfunktionen durch reverses genetisches Material ist die wichtigste Methode, um bestimmte Gene abzuschalten. Das ist von großer Bedeutung zur Bekämpfung von infektiösen und anderen, durch Störung der Genexpression bedingten Krankheiten(einschließlich AIDS). Eine Genfunktion kann in verschiedenen Ebenen außer Kraft gesetzt werden: durch homologe Rekombination auf der DNA-Ebene, durch Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozyme auf der RNA-Ebene oder durch Antikörper auf der Proteinebene. In der praktischen Umsetzung haben alle 4 Möglichkeiten Vor- und Nachteile. Für eine therapeutische Anwendung scheint nur die RNA-Inaktivierung durch Antisense-Moleküle oder durch Ribozyme durchführbar zu sein. Beide Verbindungsklassen können durch chemische Synthese oder in Verbindung mit einem Promoter durch biologische Expression in vitro oder sogar in vivo hergestellt werden. Das Prinzip der katalytischen Selbstspaltung von RNA-Molekülen und der Spaltung in trans hat sich in den letzten 10 Jahren gut etabliert. Innerhalb der RNA-Moleküle mit Ribozym-Aktivität sind die Hammerhead-Ribozyme am besten charakterisiert. Nachdem gezeigt worden ist, daß Hammerhead-Strukturen in heterologe RNA-Sequenzen integriert werden und dadurch die Ribozym-Aktivität auf dieses Molekül übertragen können, scheint es naheliegend, daß katalytische Antisense-Sequenzen für fast jede Zielsequenz mit einem übereinstimmenden Spaltort vorgesehen werden können.

Das Grundprinzip der Ribozym-Ausstattung ist sehr einfach: Man wählt eine interessierende Region der RNA aus, die das Triplet GUC (bzw. CUC) enthält, nimmt 2 Oligonukleotid-Stränge mit je 6-8 Nukleotiden und fügt die katalytische Hammerhead-Sequenz dazwischen ein.

Moleküle dieser Art wurden für zahlreiche Zielsequenzen synthetisiert, sie zeigten katalytische Aktivität *in vitro* und in manchen Fällen auch *in vivo*. Die besten Ergebnisse wurden mit kurzen Ribozymen und Zielsequenzen erzielt. Eine aktuelle Herausforderung für die *in vivo*-Anwendung ist die Konstruktion von Ribozymgenen, die eine kontinuierliche Expression des Ribozyms in einer bestimmten Zelle erlauben (Bertrand, E. et al. /1994/ Nucleic Acids Res. 22, 293-300).

Es gibt 5 potentielle Gründe, die eine befriedigende Funktion von exprimierten Ribozymen innerhalb des komplexen Zellmilieus behindern.

1. Innerhalb der Zelle existiert das mRNA-Substrat vermutlich in einer stark gefalteten Struktur, die außerdem noch durch an Teile der Struktur gebundene Proteine geschützt sein kann. Das Treffen von zugänglichen Orten innerhalb des Substrates zur Hybridisierung mit den komplementären flankierenden Regionen des Ribozyms ist eine Frage der aktuellen Wahrscheinlichkeit. Computergestützte Vorhersagen von möglichen thermodynamisch stabilen Sekundärstrukturen können für die Suche nach Loop-Regionen ohne Basenpaarung nützlich sein, aber die physiologische Relevanz dieser Konformationsmodelle ist noch unsicher.
2. Da die Ziel-mRNA sofort aus dem Zellkern heraustransportiert wird, muß das Ribozym auch in das Zytoplasma übergehen, bevorzugt auf dem selben Wege. Es ist jedoch schwierig, eine Kolo-kalisation von Ribozymen und ihrem Substrat zu erreichen.
3. Der Einsatz von Ribozymen *in vivo* erfordert die Einfügung von Ribozymgenen in geeignete Expressionskassetten. Die Transkription dieser Konstrukte kann mRNAs produzieren, in denen die zentrale katalytische Sekundärstruktur der Ribozyme durch andere, stabilere Basenpaarungen innerhalb der nichtkomplementären flankierenden Sequenzen verdrängt wird.
4. Ein Überschuß (100-1000fach) an Ribozym-Molekülen gegenüber der Zielsequenz ist notwendig, um ein registrierbares Ansteigen des RNA-Niveaus zu erreichen. Die Produktion von 10^5 - 10^6 Ribozym-Molekülen pro Zelle über eine lange Periode hinweg kann jedoch

zytotoxische Wirkung haben. Im allgemeinen sind solche hohen Expressionsniveaus nicht stabil. Die Notwendigkeit des Überschusses an Ribozymen wird durch die ungenügende Stabilität der Ribozyme gegenüber Nukleasen, durch den ineffektiven Transport zum Zytoplasma und durch den nicht optimalen Umsatz-Faktor der Spaltungsreaktion hervorgerufen.

5. Die Kinetik der Spaltungsreaktion und die Fähigkeit der Ribozyme, Multi-Umsatz-Reaktionen durchzuführen, hängt von den Bindungsparametern und der Struktur der komplementären flankierenden Regionen der Ribozyme ab. Zelluläre Proteine können die Katalyse der Spaltungsreaktion beeinflussen, wahrscheinlich mit Hilfe der Dissoziation des Ribozyms vom Substrat der Spaltung, das die Vorstufe zur nächsten Spaltung darstellt. Bis heute ist es nicht möglich, die optimale Struktur der flankierenden Regionen für ein Ribozym vorherzusagen, um hohe Spezifität und einen hohen Umsatz zu garantieren.

Insgesamt kann man feststellen, daß trotz vieler Bemühungen zur Konstruktion spezifischer Ribozym-Gene nur Teilerfolge erzielt wurden, meist auf der Basis von "trial and error"-Experimenten.

Die Erfindung hat das Ziel, die Bereitstellung optimaler Ribozyme für beliebige Zielsequenzen zu ermöglichen. Diese Ribozyme sollen effektiv exprimierbar, stabil und in vivo einsetzbar sein, vorzugsweise für die Identifizierung und zum Abschalten von Genen bei Erkrankungen.

Der Grundgedanke der Erfindung besteht darin, das Verfahren so zu führen, daß eine gesuchte bzw. für das Abschalten vorgesehene Zielsequenz sich das passendste Ribozym aus einem Angebot von Ribozymen mit bekannter Stabilität und Struktur selbst herausucht. Das wird erfindungsgemäß dadurch realisiert, daß eine Ribozym-Bibliothek angelegt wird, die aus einer optimierten Expressionskassette besteht, welche 10^8 bis 10^{11} Ribozymgene enthält. Diese Ribozyme setzen sich aus einer zentralen Hammerhead-Struktur definierter Sequenz und flankierenden Sequenzen zufälliger Basenfolge zusammen. Die Hammerhead-Struktur wird durch ein doppelsträngiges Gen kodiert, in welchem

das Hammerhead auf beiden Seiten von flankierenden Sequenzen zufälliger Basenfolge eingeschlossen ist.

Die doppelsträngige Hammerhead-Region hat bevorzugt folgende Sequenz: CTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAC, die flankierenden Sequenzen haben bevorzugt eine Länge von 6-13 Nukleotiden.

Der Aufbau der erfindungsgemäßen Ribozym-Bibliothek geht von synthetischen Oligonukleotiden mit einer Zufallssequenz von 6-13 Nukleotiden aus. Diese werden mit der Ribozymsequenz verbunden, in einen Doppelstrang umgewandelt und über flankierende Restriktionsorte in die entsprechende Insertionsstelle der Expressionskassette kloniert. In Abbildung 1 ist der Aufbau der Ribozym-Bibliothek schematisch dargestellt.

Abbildung 2 zeigt schematisch die Anwendung der Ribozym-Bibliothek; sie wird nachfolgend am Beispiel des Wachstumshormons erläutert. Wachstumshormon hat 150 theoretische Spaltstellen (Ribozym-Bindungsorte, Basenfolgen GUC bzw. CUC). Nur einige Spaltstellen werden in vivo zugänglich sein. Diese und die dazu passenden effektivsten Ribozyme sollen isoliert werden.

Dazu wird zunächst ein Pool von Ribozym-Genen synthetisch hergestellt, wobei eine zentrale "hammerhead" Ribozymsequenz von je 13 Nukleotiden zufälliger Reihenfolge flankiert wird. Diese Gene werden in einen Expressionsvektor (GvaL) für Ribozyme kloniert, wobei sie auf beiden Seiten von einer identischen Sequenz von 21 Nukleotiden flankiert werden, die eine Sekundärstrukturbildung verhindern sollen. Durch die Klonierung entsteht eine Bibliothek von ca. 10^9 Klonen. Zur Isolierung eines spezifischen Ribozyms wird das Zielgen in vitro von einem geeigneten Konstrukt transkribiert (mit T7-Polymerase oder RNA-Polymerase III) und die erhaltene RNA mit der ebenfalls in vitro transkribierten Ribozym-Bibliothek inkubiert. Anschließend werden die Spaltprodukte elektrophoretisch getrennt. Deutlich erkennbare Fragmente werden aus dem Gel präpariert und sequenziert.

Die Sequenz an den Enden der Fragmente erlaubt die Festlegung der Spaltstelle und Identifizierung des für die Spaltstelle verantwortlichen Ribozyms. Das betreffende Ribozym wird unter

Verwendung von zwei für seine flankierenden Sequenzen spezifischen Oligonukleotiden aus der Ribozym-Bibliothek amplifiziert und erneut in den Vektor GvaL kloniert (Beispiel 1).

Die Ribozymaktivität der Bibliothek wird durch Inkubation mit zellulärer RNA und deren Degradation nachgewiesen (Beispiel 2). Das Vorhandensein von Ribozymen gegen eine bestimmte Ziel-RNA, z.B. hGH, wird durch Inkubation mit einer in vitro transkribierten RNA nachgewiesen (Beispiel 3). Die Lokalisierung der Spaltstellen erfolgt durch Isolierung von Fragmenten der gespaltenen Ziel-RNA und deren Sequenzierung (Beispiel 4).

Die Spezifität und Effektivität der aus der Bank isolierten und reklonierten Ribozyme wird durch deren Inkubation mit der Ziel-RNA bestimmt (Beispiel 5).

Die biologische Wirksamkeit, d.h. die Ausschaltung der Funktion der Ziel-RNA in vivo, wird durch Transfektion des reklonierten Ribozyms mit dem Zielgen in geeignete Zellen (z.B. CHO) und nachfolgende Bestimmung der spezifischen Proteinsynthese (z.B. hGH-Sekretion) ermittelt (Beispiel 6).

Die Erfindung soll nachfolgend im einzelnen durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1:

Die Strategie ist schematisch in Abb. 3 dargestellt. Der mittlere Teil der Abbildung zeigt die Struktur des vorgesehenen Ribozympools, der obere die aktuellen Sequenzen der zwei Oligonukleotide, die angelagert und zur Bildung von doppelsträngigen Ribozym-Genen aus der Bank verlängert werden. Das entstehende Fragmentgemisch wurde in die GvaL-Kassette als XhoI-NsiI-Fragment einkloniert. Eine Bibliothek von 10^9 verschiedenen Varianten wurde geschaffen. Die Ribozyme wurden in vitro entweder durch T7-Polymerase oder polIII von einem HeLa-Extrakt synthetisiert. Als Zielsequenz wurde RNA von CHO-Zellen benutzt, welche das hGH-Gen stabil exprimiert (5000 RNA-Kopien/Zelle). Gereinigte RNA wurde mit der in vitro synthetisierten Ribozym-Bibliothek inkubiert. Nach der Reinigung der Spaltprodukte an einer oligo-dT-Säule wurde das 5'-Ende der stromabwärts-

Spaltprodukte mittels RACE-Technik wie folgt analysiert: Nach der reversen Transkription mit oligo-dT-Primern werden die cDNAs am 3'-Ende mit dG verbunden, mit einem oligodC amplifiziert und mit hGH-spezifischen Primern behandelt, in pGEMT (Promega) einkloniert und sequenziert. Die Sequenzen sollten unmittelbar stromabwärts von der NUH-Erkennungsseite (GUC, CUC) innerhalb der hGH-RNA starten. Das Gen für das Ribozym, das die Spaltung eines ausgewählten Ortes bewirkte, wurde durch PCR aus der Ribozym-Plasmid-Bibliothek amplifiziert, wobei spezifische degenerierte Primer für die flankierenden Regionen der Ribozym-Gene verwendet wurden. Nach Amplifikation wurde das entstandene Fragment zwischen die PstI- und SalI-Orte des Vektors GvaL kloniert. Unter den sequenzierten 50 Klonen wurden für drei Ribozym-Spaltorte Ribozyme mit unterschiedlich langen Flanken (7-13 Nukleotide) gefunden (Abb. 3, unten).

Beispiel 2:

Die Spaltung von zellulärer RNA wurde bei physiologischem pH (50mM Tris-Cl, pH 7,5) bei 37°C innerhalb einer Stunde mit oder ohne vorhergehende Hitzedenaturierung (90 sec bei 95°C) in einem 15 µl Reaktionsgefäß durchgeführt. Folgende Ansätze wurden gewählt:

- 1./2. Gereinigte Total-RNA (1µg/Probe) als Ziel. Ribozyme GvaLRz als T7-Transkript, in vitro-Transkript von GvaL diente als Kontrolle.
3. Zytoplasmatische RNA/Protein-Fraktion als Ziel. 10⁵ Zellen wurden im 50mM Tris-HCL (pH 7,5) 10 min in Eis lysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren, aufgetaut bei 37°C, und die Kerne wurden durch Zentrifugation entfernt. Als Ribozym wurde ein T7-Transkript von GvaLRz (10µg) verwendet.
4. Zytoplasmatische RNA als Ziel. Das Ribozym wurde durch pol III-Transkription (2µg/Probe) hergestellt.

Die deutlichsten Spaltungen werden mit T7-Transkripten und totaler bzw. auch zytoplasmatischer RNA erhalten.

Beispiel 3:

Spezifische in vitro-Spaltung von hGH-mRNA durch Ribozym aus der Bibliothek.

Totale oder zytoplasmatische RNA-Präparationen aus hGH-produzierenden Zellen werden mit Ribozymen aus der Bibliothek inkubiert, die entweder mit pol III oder T7-Polymerase transkribiert wurde. hGH-spezifische 3'-Fragmente werden revers transkribiert und durch PCR amplifiziert. Die PCR-Bedingungen werden so gewählt, daß hauptsächlich Fragmente >1000bp entstehen. PCR-Produkte werden auf einem 6% PAA-Gel aufgetrennt, Marker für die Fragmentgröße werden auf der linken Bahn aufgetragen. Es wurden 6 spezifische Banden gefunden, deren korrespondierende Fragmentlänge mit einer in 4 Exonorten (E1-E4) und 2 Intronorten (I1,I2) korrelieren. Es ist festzustellen, daß T7 pol Transkripte leichter nachzuweisen sind und daß es mehr Spaltstellen in Total-RNA gibt als in zytoplasmatischer RNA.

Beispiel 4: Lokalisierung von Ribozym-Spaltorten innerhalb von hGH mRNA

Die Fragmente E1-E4 und I1,I2 werden aus dem Gel geschnitten, gereinigt und in pGEMT einkloniert. Von jedem Fragment werden 20 Klone sequenziert. Etwa 50% der Klone starten entweder an einem CUC- oder einem GUC-Ort. Die anderen 50% repräsentieren wahrscheinlich Abbauprodukte.

Die Spaltorte gemäß den Fragmenten sind in der Sequenz von hGH enthalten. E1: 1017 (Exon IV), E2: CTC 1401 (Exon V), E3: CTC 1422 (Exon V), E4: CTC 1441 (Exon V), E5 (stammt von einem gesonderten Experiment): GTC (Exon IV), I2: CTC 1099 (Intron IV), I1: GTC (Intron IV)(Abb.4).

B, Mit dem Programm HUSAR, MFOLD, wurde eine graphische Darstellung mit PLOTFOLD erhalten (Abb.5).

Beispiel 5: Spaltung in vitro von hGH-spezifischer RNA durch Ribozyme aus der Bibliothek

A. Spaltung mit 3 verschiedenen selektierten Ribozymen. Die Ribozyme werden mit T7-Polymerase von jeweils einem selektierten Klon umgeschrieben und mit in vitro transkribierter hGH RNA der

gleichen Molarität (beide 100nM) für 20 min bei 37°C ohne Hitzedenaturierung inkubiert. Proben werden auf ein denaturiertes 6% PAA-Gel aufgebracht. Die entstehenden Bruchstücke haben die erwartete Größe (E1: 1017, 646; I1: 1099, 564; E5: 952,711).

B. Spaltung von hGH RNA durch E1-Ribozym mit verschiedener Länge der komplementären Regionen. Die Inkubation erfolgte wie in A. Die Fragmentabtrennung erfolgte auf einem 4% denaturiertem PAA-Gel. Die Länge der komplementären Region des E1-Ribozyms beträgt 26=13/13, 21=10/11 bzw. 15=8/7 (Abb.3, unten). Es ist festzustellen, daß die 2 spezifischen Spaltprodukte nur nach Inkubation mit Ribozymen in der Gegenwart von Magnesium nachweisbar sind. Die effektivste Spaltung ist bei der kürzesten Komplementarität zu finden (15=8/7).

Beispiel 6: Effekt der Ribozymexpression in vivo auf das Niveau der hGH-Sekretion

Die Transfektion von CHO-Zellen erfolgte gleichzeitig mit pCMVhGH, Ribozymen oder Kontrollkonstrukten und pSV2neo. Die Kurzzeit-Expression wurde nach 3 Tagen und die stabile Expression nach Selektion mit Geneticin nach 4 Wochen getestet. Das hGH-Niveau wurde mit ELISA (Nachweisgrenze 3ng/ml) festgestellt. Das Niveau des erhaltenen hGH mit pCMVhGH +GvaL wurde als 100% angesetzt (Kurzzeit: 7 µghGH/ml/24hrs; stabile: 2µg hGH/ml/24hrs).

Die Resultate eines typischen Experiments sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Expression System	pol III		pol III		T7 pol		T7 pol	
		kurzzeitig hGH (%)		stabil hGH (%)		kurzzeitig hGH (%)		stabil hGH (%)
GvaL		100		100		100		100
E1 (13/13)		36		85		78		2
E1 (10/11)		12		50		-		-
E1 (8/7)		7		25		75		0,2
E1 (8/7)mut.		95		92		90		87
I1 (8/8)		42		78		-		-
E5 (8/7)		32		50		-		-

Tabelle 1

Patentansprüche

1. Ribozym-Bibliothek,
bestehend aus
einer optimierten Expressionskassette, welche Ribozym-Gene
enthält, die aus einer zentralen Hammerhead-Struktur definierter
Sequenz und flankierenden Sequenzen zufälliger Basenfolge
bestehen.
2. Ribozym-Bibliothek nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die optimierte Expressionskassette einen T7-Promoter, ein
adenovirales va-RNA-Gen und eine stabile Loop-Region enthält.
3. Ribozym-Bibliothek nach Anspruch 1 und 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie 10^9 - 10^{11} Ribozym-Gene enthält.
4. Ribozym-Bibliothek nach Anspruch 1-3,
dadurch gekennzeichnet,
daß die zentrale Hammerhead-Struktur eine doppelsträngige DNA
der Sequenz CTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAC umfaßt.
5. Ribozym-Bibliothek nach Anspruch 1-4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die flankierenden Sequenzen auf beiden Seiten der
Hammerhead-Struktur je 6-13 Nukleotide umfassen.
6. Verfahren zur Herstellung der Ribozym-Bibliothek,
dadurch gekennzeichnet,
daß synthetische Oligonukleotide mit einer Zufallssequenz von 6-
13 Nukleotiden und der Ribozymsequenz hergestellt, in einen
Doppelstrang umgewandelt und über flankierende Restriktionsorte
in die entsprechende Insertionsstelle der Expressionskassette
kloniert werden.

7. Verfahren zur Verwendung der Ribozym-Bibliothek,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das die gewünschte Zielsequenz enthaltende Material mit
der Ribozym-Bibliothek inkubiert, die erhaltenen Spaltprodukte
identifiziert und die für die Spaltung verantwortlichen Ribozyme
isoliert.
8. Verwendungsverfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Material
- in vitro transkribierte RNS,
- Total-RNS oder
- zytoplasmatische RNS von Zellen
eingesetzt und die Inkubation in Anwesenheit von 100µm Mg-Salz
durchgeführt wird.
9. Verwendungsverfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Identifizierung der Spaltprodukte durch die PCR-Reaktion
mit genspezifischen Primern und nachfolgende Gelelektrophorese
erfolgt.
10. Verwendungsverfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die für die Spaltung verantwortlichen Ribozyme durch
Ausschneiden der Spaltprodukte aus dem Gel und nachfolgende
Sequenzierung der Spaltstellen identifiziert werden.
11. Verwendungsverfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß das als wirksam erkannte Ribozym aus der Bibliothek durch
Hybridisierung mit 2 für dieses Ribozym spezifischen
Oligonukleotiden isoliert und als Expressionsklon verwendet
wird.

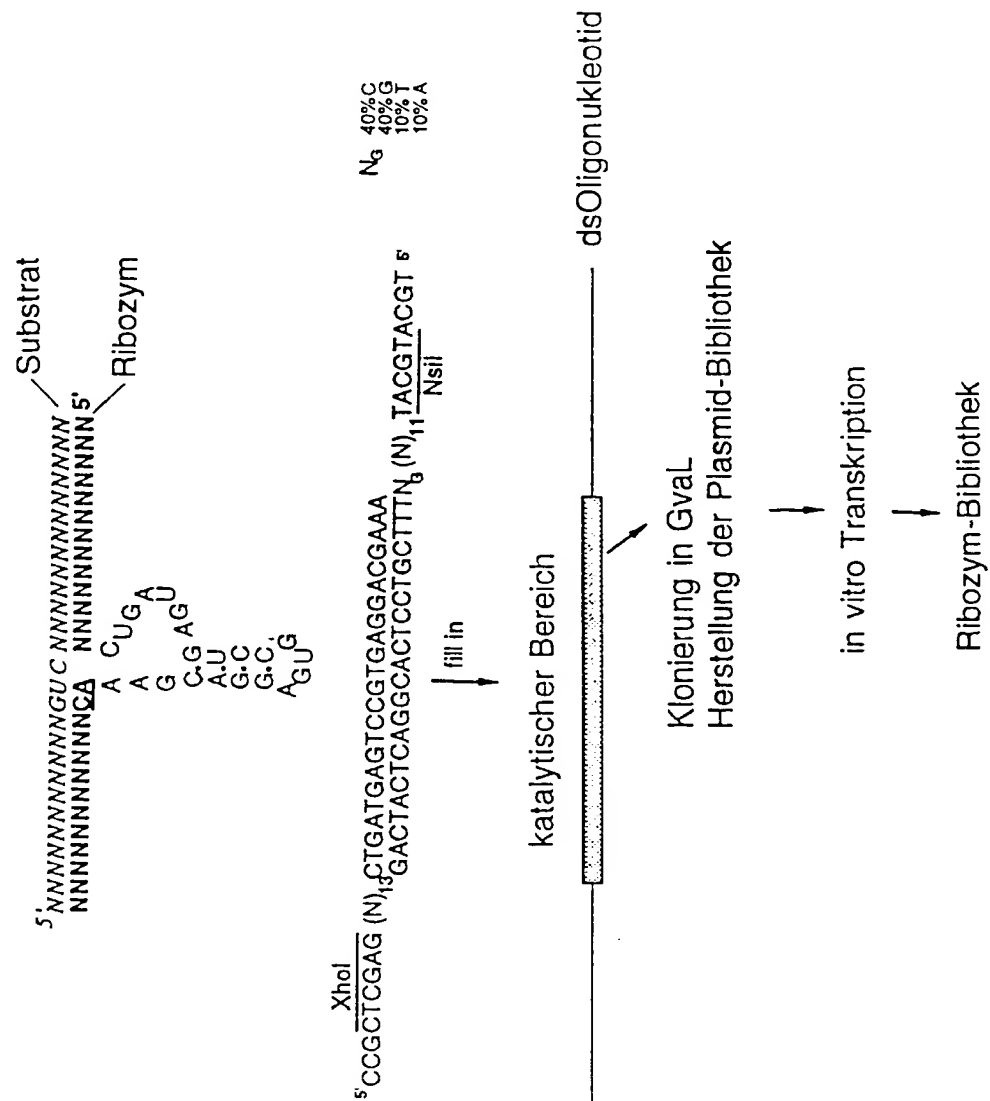


Abb. 1: Erstellung der Ribozym-Bibliothek.

ERSATZBLATT

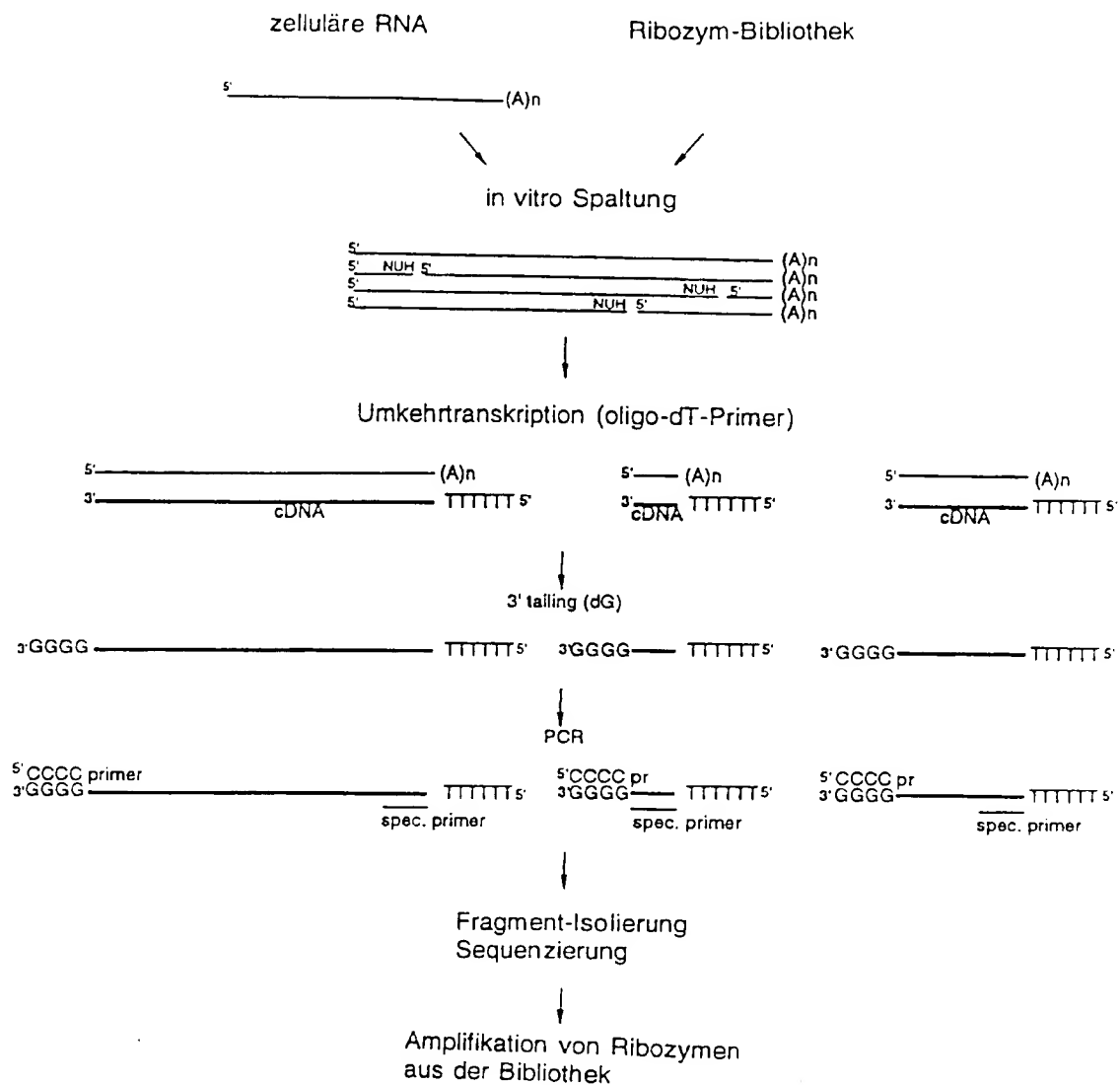


Abb. 2: Anwendung der Ribozym-Bibliothek.

ERSATZBLATT

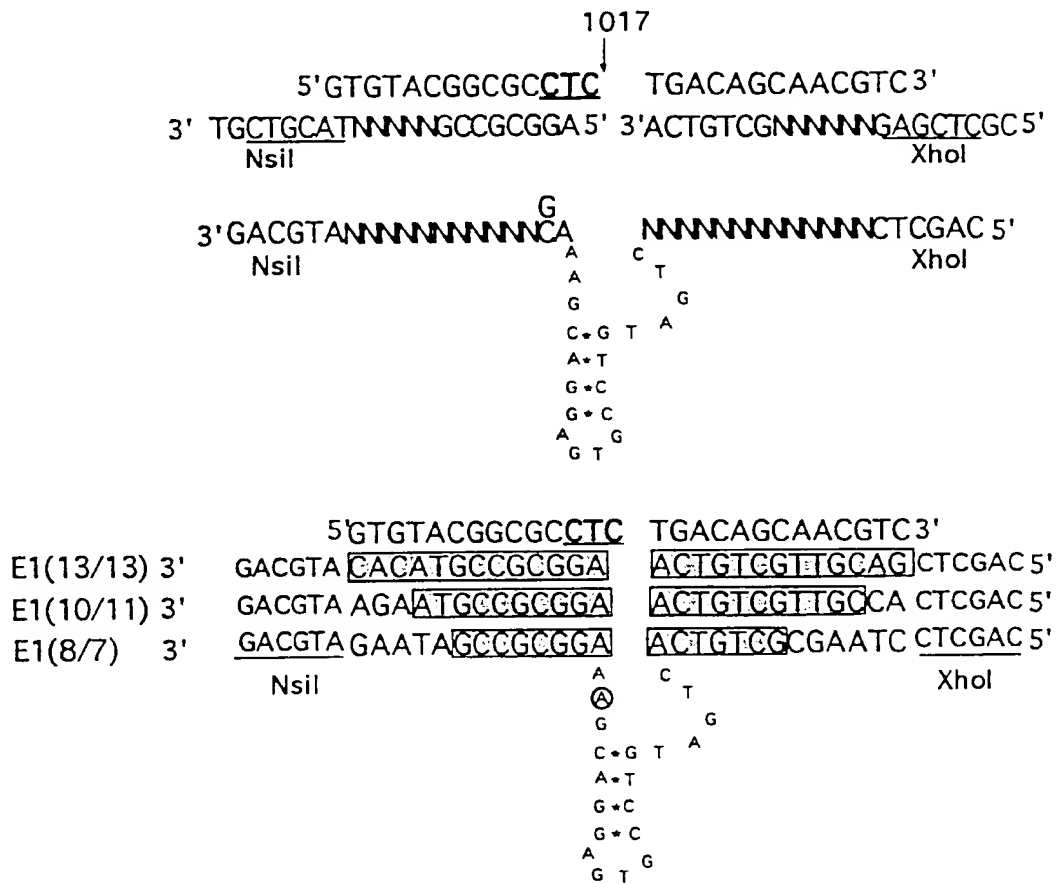


Abb. 3: Sequenz hGH-ortsspezifischer Primer (oben);
Sequenz der Ribozyme aus der Bibliothek (mitte);
Sequenzen von drei aus der Bibliothek isolierten Ribozymen
(unten).

ERSATZBLATT

841 AGGCGGGGATGGGGGAGACCTGTAGTCAGAGCCCCCGGGCAGCAGCCAAATGCCCGTCC
 901 TTGCCCCCTGCAGAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTGGTGGCTG
 961 GAGCCCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGGCTCTGAC
 1021 AGCAACGTCATATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGGTG
 1081 AGGGTGGCGGCCAGGGGTCCCCAATCCTGGAGCCCCACTGACTTTTGAGAGACTGTGTTAGA
 1141 GAAACACTGGCTGCCCTCTTTTATAGCAGTCAGGCCCTGACCCAAAGAGAACTCACCTTATT
 1201 CTTCAATTTCCCTCGTGAATCCTCCAGGCCCTTTCTTACACTGAAGGGGAGGGAGGAAAA
 1261 TGAATGAATGAGAAAGGGAGGGAACAGTACCCAGCGCTTGGCCCTCTCCTTCTCTCCTT
 1321 CACTTTGCAGAGGCTGGAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTA
 1381 CAGCAAGTTCGACACAAAACCTCACACAAACGATGACGCACTACTCAGAACTACGGGGCTGCT
 1441 CTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTGGGCATCGTGCACTGGCGG
 1501 CTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGCTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCC
 1561 AGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGGCCACCCAGCCCTTGTCTTAATAAA
 1621 ATTAAAGTTGCAT

Abb. 4: Sequenz eines Teils des hGH-Gens. Identifizierte Spaltorte in der hGH-RNA sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die mRNA-kodierende Sequenz ist unterstrichen.

ERSATZBLATT

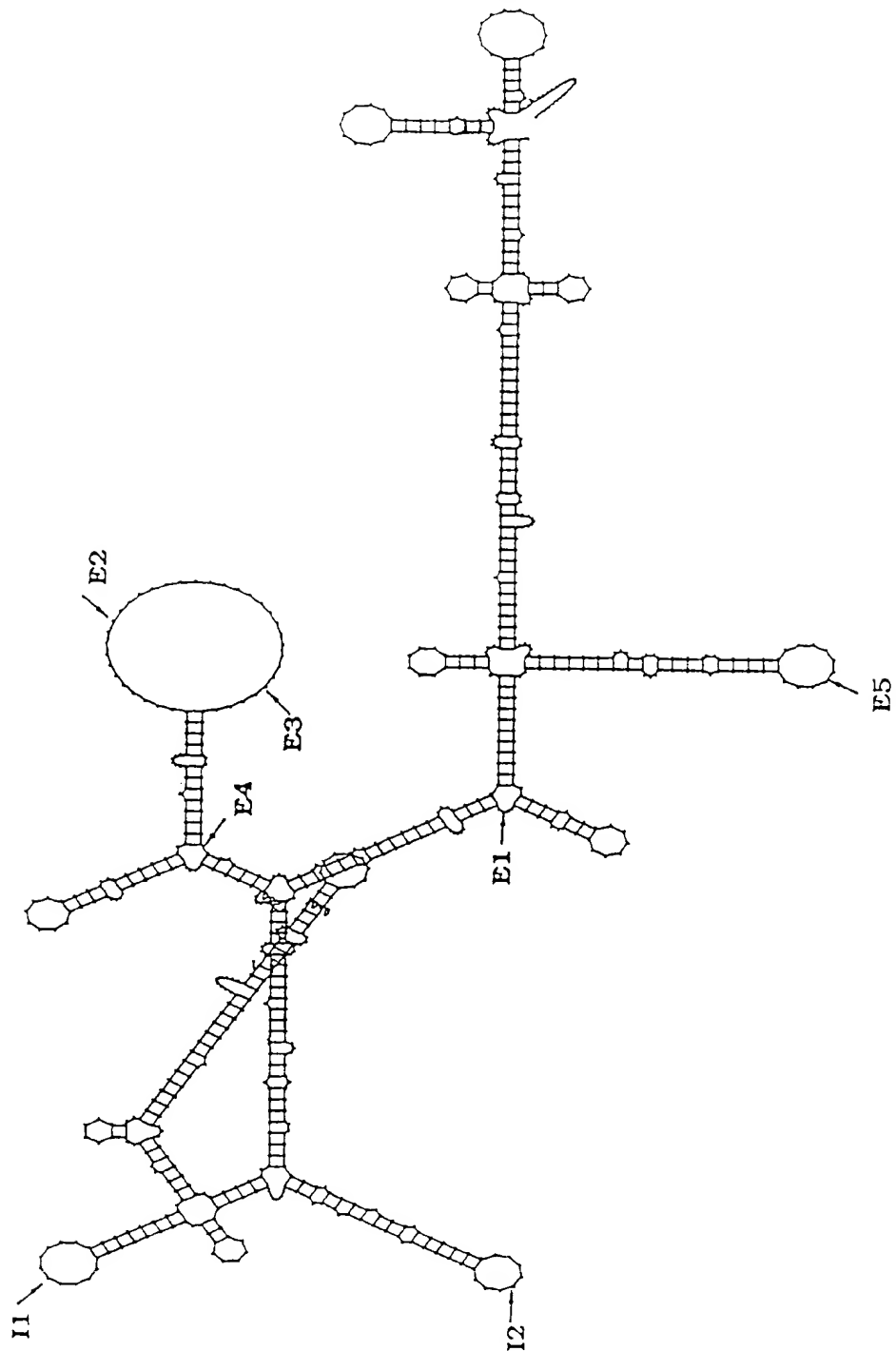


Abb. 5: Sekundärstruktur der transkribierten hGH-prä-mRNA im Bereich der in Abb. 4 gezeigten Teilsequenz. Pfeile zeigen die identifizierten Ribozym-Spaltorte.

ERSATZBLATT

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DER PATENTE



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/11, 15/63, 15/86, 9/00</p>	<p>A3</p>	<p>(11) Int. WO 9601314A3 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Januar 1996 (18.01.96)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/00662 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Mai 1995 (19.05.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 24 762.1 4. Juli 1994 (04.07.94) DE (71) Anmelder: MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE], Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE). (72) Erfinder: LIEBER, Andre; Arkonastrasse 57, D-13189 Berlin (DE). STRAUSS, Michael; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biozet Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 29. Februar 1996 (29.02.96)</p>
<p>(54) Title: RIBOZYME LIBRARY, ITS PRODUCTION AND USE (54) Bezeichnung: RIBOZYM-BIBLIOTHEK, IHRE HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG (57) Abstract The object of the invention is to allow the production of optimum ribozymes for any desired target sequence. It should be possible to effectively express and use <i>in vivo</i> these ribozymes, preferably to identify and neutralise genes for the treatment of diseases. The invention has applications in molecular biology, genetic engineering and medicine. For that purpose, a ribozyme library is constructed that contains 10⁹-10¹¹ ribozyme genes in an optimised expression cartridge. The ribozyme genes consist of a central Hammerhead structure having a defined sequence flanked by sequences with a random series of bases. The sequences located on both sides of the Hammerhead structure preferably contain 6-13 nucleotides. In order to use this ribozyme library, it is incubated with a material containing the desired target sequence, the thus obtained split products are identified and the ribozymes responsible for the splitting are isolated. (57) Zusammenfassung Die Erfindung hat das Ziel, die Bereitstellung optimaler Ribozyme für beliebige Zielsequenzen zu ermöglichen. Diese Ribozyme sollen effektiv exprimierbar und <i>in vivo</i> einsetzbar sein, vorzugsweise für die Identifizierung und zum Abschalten von Genen bei Erkrankungen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekularbiologie, die Gentechnik und die Medizin. Erfindungsgemäß wird eine Ribozym-Bibliothek aufgebaut, die in einer optimierten Expressionskassette 10⁹-10¹¹ Ribozym-Gene enthält. Diese Ribozym-Gene bestehen aus einer zentralen Hammerhead-Struktur definierter Sequenz und flankierenden Sequenzen zufälliger Basenfolge. Die flankierenden Sequenzen auf beiden Seiten der Hammerhead-Struktur umfassen bevorzugt 6-13 Nukleotide. Die Verwendung dieser Ribozym-Bibliothek erfolgt durch Inkubation mit dem die gewünschte Zielsequenz enthaltenden Material, Identifizierung der erhaltenen Spaltprodukte und Isolierung der für die Spaltung verantwortlichen Ribozyme.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Verinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/DE 95/00662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/11 C12N15/63 C12N15/86 C12N9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. CELL BIOCHEM SUPPL. 0, vol. 17, no. E, 1993 MACEJAK, D.G. AND DRAPER, K. 'Design of quasi-random ribozyme expression vectors' abstract S206 *whole document*	7-11
A	FR-A-2 687 411 (UNIVERITE DE NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS) 20 August 1993 *whole document*	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 November 1995

Date of mailing of the international search report

28.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 95/00662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2687411	20-08-93	NONE	

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Intern. als Aktenzeichen

PCT/DE 95/00662

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/11 C12N15/63 C12N15/86 C12N9/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J. CELL BIOCHEM SUPPL. 0, Bd. 17, Nr. E, 1993 MACEJAK, D.G. AND DRAPER, K. 'Design of quasi-random ribozyme expression vectors' Abstrakt S206 *insgesamt*	7-11
A	FR-A-2 687 411 (UNIVERITE DE NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS) 20. August 1993 *insgesamt*	1-6

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. November 1995

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

28.12.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internales Aktenzeichen

PCT/DE 95/00662

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR-A-2687411	20-08-93	KEINE	
